学校编码：10384　　分类号_____密级_____
学　　号：20520100153645　　UDC _____

厦门大学

博 士 学 位 论 文

构建阿霉素核-H 亚基铁蛋白且用于药效分析、抑制 HepG2 细胞生长的差异蛋白质组学研究

Construction of Adriamycin Core-Human H Subunit Ferritin for Analysis of Its Drug Effective and Differential Proteomics of HepG2 Cell Line During Inhibition Growth

指导教师姓名：黄河清　教授
专　业　名　称：化学生物学
论文提交日期：2014 年 7 月
论文答辩时间：2014 年 9 月
学位授予日期：2014 年 9 月

答辩委员会主席：_____
评阅人：_____

2014 年 9 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（　　）课题（组）的研究成果，获得（　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　年　月　日解密，解密后适用上述授权。

（　　）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

目 录

Content

摘 要

人铁蛋白由于具有独特的纳米笼状结构、合适的大小、良好的生物安全性以及易于通过化学或遗传学的方法进行表面改造等特性而成为理想的肿瘤靶向给药载体，因而受到了科学家们的广泛关注。本文构建了 pET-21b-FTH1、pET-28a-FTH1 和 pGEX-4T-1-FTH1 三种人铁蛋白 H 亚基原核表达载体，经检测，三种表达载体中 pGEX-4T-1-FTH1 的表达效率最高，且在 0.3 mM IPTG、25 ℃条件下诱导表达能够同时兼顾表达效率和融合蛋白溶解性。经 SDS-PAGE 与 PMF 鉴定，pGEX-4T-1-FTH1 表达的重组融合蛋白在切除 GST 标签后确为人铁蛋白 H 亚基。而且，经透射电子显微镜观察，重组人铁蛋白 H 亚基能够在生理条件下自发组装成缺铁核人 H 亚基铁蛋白（HFt）的纳米笼状结构。

阿霉素与顺铂均为临床上治疗肿瘤的一线用药，但它们都存在半衰期短、副作用大等不足。本文首先构建了阿霉素核-H 亚基铁蛋白（D-HFt），其阿霉素包装量约为 24.8%（质量分数）。荧光显微镜观察显示，FITC 标记的 HFt 能与 HepG2 细胞靶向结合并进入细胞的内部。异体移植 HepG2 肿瘤的裸鼠活体（*in vivo*）与离体（*ex vivo*）成像显示，近红外荧光染料 Cy7.5 标记的 D-HFt 在荷瘤裸鼠体内的半衰期较阿霉素要长得多，且 D-HFt 具有很好的肿瘤靶向性。异体移植 HepG2 肿瘤裸鼠的治疗实验显示，在同等给药剂量和给药频率的条件下，D-HFt 对肿瘤生长的抑制情况优于阿霉素。同时，治疗后荷瘤裸鼠主要器官石蜡切片的苏木精－伊红染色显示未观察到 D-HFt 对荷瘤裸鼠的主要器官造成明显的病理异常如出血、水肿、淋巴细胞浸润、坏死等现象。

液相色谱-质谱联用（LC-MS）技术是目前蛋白质组学研究的主要技术手段之一。本文利用 LC-MS 对 D-HFt 与阿霉素作用于 HepG2 细胞 24 h 后的差异表达蛋白质组进行了研究，找到了 37 个差异表达的蛋白。其中 EEF1A1 等 19 个蛋白在 D-HFt 组中表达上调，CFL1 等 18 个蛋白表达下调。这些结果为进一步研究 D-HFt 较阿霉素具有更好的疗效所蕴含的分子机制奠定了基础。

另外，本文还构建了纳米顺铂核-H 亚基铁蛋白（NCC-HFt），并利用 LC-MS 对 NCC-HFt 与顺铂作用于 HepG2 细胞 24 h 后的差异表达蛋白质组进行了研究，

找到了 24 个差异表达的蛋白。其中 AHSG 等 19 个蛋白在 NCC-HFt 组中表达上调，ALDOA 等 5 个蛋白表达下调。这些结果有利于进一步研究 NCC-HFt 所具有的缓释作用对疗效的影响。

关键词：铁蛋白；靶向给药；蛋白质组学

Abstract

Human ferritin has unique nanocage structure, appropriate size, excellent biosafety and easily modified surface with either genetically or chemically methods. Because of these characters, it became an ideal tumor targeting drug delivery carrier, and focused by many scientists. In this thesis, we constructed three expression vectors, pET-21b-FTH1, pET-28a-FTH1 and pGEX-4T-1-FTH1, for expressed human ferritin H subunit in *E. coli*. After tested these three vectors, we found pGEX-4T-1-FTH1 was the most efficient expression vector in them, and 0.3 mM IPTG with 25 ℃ were the optimized induction conditions for its expression. These conditions could balance expression efficiency with solubility of the recombinant fusion protein. After identified with SDS-PAGE and PMF, we were sure it was human ferritin H subunit when GST tag removed from the recombinant fusion protein expressed by pGEX-4T-1-FTH1 using thrombin cleavage. Furthermore, we observed in TEM images that recombinant human ferritin H subunits had self-assembled to human H-ferritin (HFt) nanocages under physiological conditions.

Doxorubicin and cisplatin are both first-line chemotherapy drug for tumor treatment. But they all have short circulation half-life and strong side effects. In this thesis, we constructed doxorubicin core recombinant human H-ferritin (D-HFt), which doxorubicin loading rate was about 24.8% (wt%). Fluorescence microscopy observation demonstrated FITC labeled HFt can bind to HepG2 cells and internalized by cells. When studied on HepG2 subcutaneous tumor models in nude mice, these D-HFt showed a longed circulation half-life, higher tumor uptake, better tumor growth inhibition, and less side effects than free doxorubicin. Besides, H&E staining found necrosis in the tumors treated with D-HFt, but no obvious pathological abnormalities such as hemorrhage, edema, lymphocyte infiltration and necrosis in major organs including the heart.

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) technique is one of the main

methods using in proteomics research at present. We studied differential expressed proteome after treated HepG2 cells with D-HFt or doxorubicin 24 h using LC-MS technique, and found 37 differential expressed proteins. In them, the expression of 19 proteins were up-regulated such as EEF1A1, and 18 were down-regulated such as CFL1. These results could help us to understand why D-HFt had better effects compared with free doxorubicin, and the molecular mechanism beneath in future studies.

In addition, we constructed nanometer cisplatin core recombinant human H-ferritin (NCC-HFt). We also studied differential expressed proteome after treated HepG2 cells with NCC-HFt or cisplatin 24 h using LC-MS technique, and found 24 differential expressed proteins. In them, the expression of 19 proteins were up-regulated such as AHSG, and 5 were down-regulated such as ALDOA. These results could help us to understand the influence to cells due to slow-release function of NCC-HFt, and the molecular mechanism beneath in future studies.

Key Words: ferritin; targeting durg delivery; proteomics

缩略语

2-DE：two-demensional electrophoresis，双向电泳

ACN：acetonitrile，乙腈

APS：ammonium persulfate，过硫酸铵

BSA：bovine serum albumin，牛血清白蛋白

CDDP：Cisplatin，顺铂

CHAPS：3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio] propanesulfonate，3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐

CHCA：α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid，α-氰-4-羟肉桂酸

DEPC：iethypyrocarbonate，焦碳酸二乙酯

D-HFt：Doxorubicin core recombinant human H-ferritin，阿霉素核-H 亚基铁蛋白

DMSO：Dimethyl sulfoxide，二甲基亚砜

Dox：Doxorubicin，阿霉素

DTT：dithiothreitol，二硫苏糖醇

FDR：False discovery rate，错误发现率

FITC：fluorescein isothiocyanate，异硫氰酸荧光素

GST：Glutathione S-transferase，谷胱甘肽 S 转移酶

H&E：Hematoxylin and eosin stain，苏木精-伊红染色

HFt：human H-ferritin，人 H 亚基铁蛋白

IAA：iodoacetamide，碘乙酰胺

IEF：isoelectric focusing，等电聚焦

LC-MS：Liquid chromatography - mass spectrometry，液相色谱-质谱联用

LC-MS/MS：Liquid chromatography - tandem mass spectrometry，液相色谱-串联质谱联用

MALDI-TOF-MS：matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry，基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱